ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Année 1971 n° 24

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE DANS LA MALADIE DES MUQUEUSES DES BOVINS

THÈSE

POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Diplôme d'Etat

présentée et soutenue publiquement en avril 1971

devant

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

par

DEVIC *(Henri, Pierre)*

né le 24 février 1946 à MONTAUBAN
(Tarn et Garonne)

JURY :

Président Mme ENJALBERT, *Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.*
M. SAURAT, *Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.*
M. LAUTIE, *Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.*

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Année 1971 *n° 24*

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNOFLUORESCENCE DANS LA MALADIE DES MUQUEUSES DES BOVINS

THÈSE
POUR LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Diplôme d'Etat

présentée et soutenue publiquement en avril 1971

devant

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE

par

DEVIC *(Henri, Pierre)*

né le 24 février 1946 à MONTAUBAN
(Tarn et Garonne)

JURY :

Président Mme ENJALBERT, Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.
M. SAURAT, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
M. LAUTIE, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Ministère de l'Agriculture

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. FLORIO
Directeur Honoraires : MM. PONS, DARRASPEN
Professeur Honoraire : M. LOMBARD

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire — M. GODFRAIN
Maitre Assistant Agrégé — Mme BURGAT-SACAZE
Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire — M. RICO
Maître-Assistant Agrégé — M. LORGUE
Physique biologique et médicale
Chimie biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire — M. PAVAUX
Anatomie descriptive - Extérieur
Anotomie appliquée - Tératologie

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire — M. RUCKEBUSCH
Maitre-Assistant Agrégé — M. FARGEAS
Physiologie - Thérapeutique et Pharmacodynamie

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire — M. VAN HAVERBEKE
Maitre de conférence, non Chef de Service,
Prof. sans chaire — M. CABANIE
Histologie - Embryologie - Anatomie Pathologique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire — M. LABIE
Maître-Assistant — M. EECKHOUTTE
Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie
des denrées alimentaires d'origine animale

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire — M. BRIZARD
Maître-Assistant — M. DORCHIES
Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES

Professeur titulaire — M. FLORIO
Maître de Conférences, non Chef de Service,
Prof. sans Chaire — M. LESCURE
Maître-Assistant — M. GUELFI
Sémiologie et Pathologie Médicale des Equidés
et des Carnivores - Législation Vétérinaire
et déontologie - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COU

Professeur titulaire — M. TOURNUT
Maître de Conférences, non Chef de Service,
Prof. sans Chaire — M. ESPINASSE
Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail
et des animaux de basse-cour - Clinique
Clinique ambulatoire

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire — N.
Maître de Conférences, Chef de Service — M. CAZIEUX
Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale -
Technique Chirurgicale - Pathologie Chirurgicale
Podologie - Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire — M. BERTHELON
Maître de Conférences, non Chef de Service,
Prof. sans Chaire — M. ROYAL
Sémiologie et propédeutique - Pathologie de
la Reproduction - Obstétrique - Clinique

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire — M. SAURAT
Maître-Assistant — M. CHANTAL
Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire — M. LAUTIE

Microbiologie - Immunologie - Pathologie Générale

CHAIRE DE ZOOTECHNIE ET ECONOMIE RURALE

Professeur titulaire — M. QUEINNEC

Maître-Assistant — M. DARRE

Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène Générale - Zootechnie - Elevage - Economie Générale et des productions animales

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire — M. FALIU

Maître-Assistant Agrégé — M. GRIESS

Botanique appliquée et Bromatologie - Agronomie - Alimentation

COURS COMPLEMENTAIRES - CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Antibiothérapie des Maladies Infectieuses	M. MONNIER
Aspect médical des Zoonoses	M. ARMENGAUD
Energétique	M. LABOUCHE
Initiation à l'Informatique Biomédicale	M. FERNET
Agronomie	M. COMBRET
Métabolismes	M. RAYNAUD

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté, en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 juin 1924).

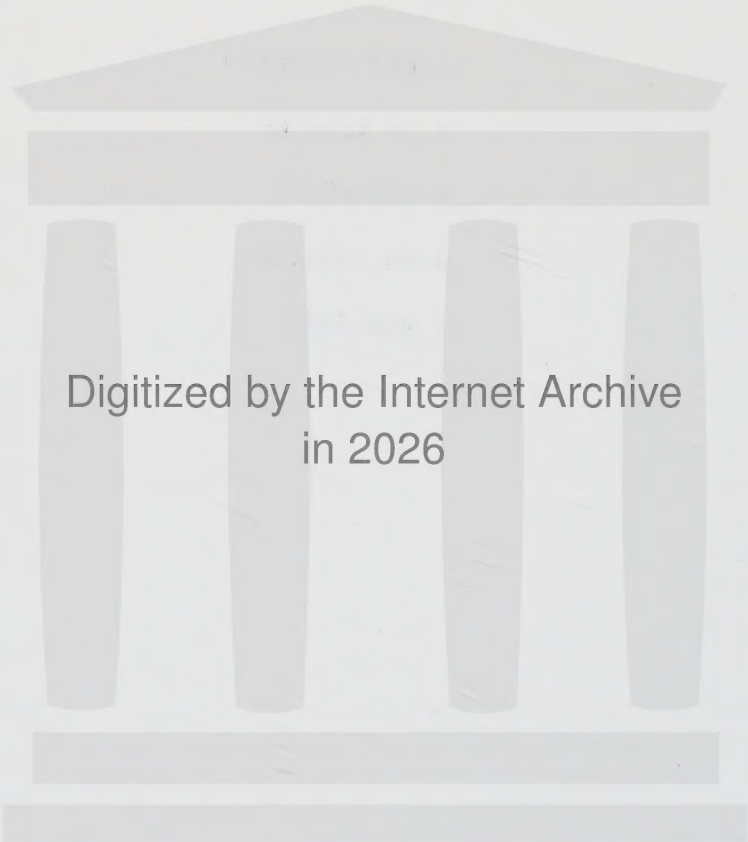
A MES PARENTS

A MA FIANCEE

A MON FRERE

A MA FAMILLE

A MES AMIS


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536520_0033

A NOTRE JURY DE THESE

Madame le Professeur ENJALBERT

de l'Université Paul Sabatier
de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur d'accepter
la présidence de notre Jury de Thèse.
Hommages respectueux.

Monsieur le Professeur SAURAT

de l'Ecole Nationale Vétérinaire
de Toulouse
Chevalier de la Légion d'Honneur

Qui a bien voulu nous confier ce travail
sur un sujet qui lui tient à coeur.
Qu'il trouve ici le témoignage de notre
profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur LAUTIE

de l'Ecole Nationale Vétérinaire de
Toulouse
Chevalier de l'Ordre National du Mérite

En reconnaissance de son enseignement
que nous avons apprécié durant notre
scolarité.

A Monsieur Y. GILBERT

Vétérinaire Inspecteur en chef du corps autonome des vétérinaires inspecteurs de la France d'Outre Mer

Qui nous a aidé à l'élaboration de notre thèse.
Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance.

A Monsieur le Docteur CHANTAL

Maître Assistant de Maladies Contagieuses et Zoonoses.

Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude pour l'aide qu'il nous a apportée et pour la sympathie qu'il nous a toujours témoignée.

A NOS MAITRES DE L'ECOLE VETERINAIRE DE TOULOUSE

CONTRIBUTION A L'ETUDE

DE L'IMMUNOFLUORESCENCE

DANS LA MALADIE DES MUQUEUSES DES BOVINS

Avant d'aborder le problème de l'Immuno-fluorescence dans la Maladie des Muqueuses des Bovins, il nous a paru intéressant de classer notre travail dans son contexte général, en rappelant les caractères de cette maladie et de son agent causal. Nous nous sommes largement inspirés pour cette étude bibliographique du chapitre concernant la Maladie des Muqueuses, rédigé par DINTER, dans le "Traité des maladies à virus des animaux" (Tome II) de ROEHRER (77).

LA MALADIE DES MUQUEUSES

DEFINITION

La Maladie des Muqueuses est une maladie infectieuse, contagieuse, virulente et inoculable, atteignant les bovins, caractérisée principalement par des altérations des muqueuses digestives, d'évolution aigüe, se transmettant vraisemblablement par contact. Elle s'exprime par de la fièvre et de la leucopénie, accompagnée d'anorexie, de salivation abondante, de jetage, d'érosions et d'ulcérations de la muqueuse buccale, de diarrhée entraînant une baisse de l'état général et de la deshydratation.

HISTORIQUE

OLAFSON et RICKARD (63) décrivent en 1946 aux U. S. A., dans l'état de New-York, une maladie nouvelle des bovins, manifestement causée par un virus, qui reçoit le nom de "Diarrhée à Virus des bovins" ; elle ressemble à la peste Bovine, mais s'en différencie immunologiquement (92). RAMSEY et CHIVERS (73) en 1953 décrivent une autre maladie des bovins dans l'Iowa et d'autres états des U. S. A. ; ils la dénomment "Maladie des Muqueuses", bien qu'ayant des caractères communs avec la Diarrhée à Virus. Dans l'Indiana PRITCHARD et Coll. (65) en 1954 décrivent encore une autre maladie dont la description diffère quelque peu de celle de la Diarrhée à Virus. On commence donc à distinguer les deux formes New-York et Indiana de la Diarrhée à Virus et la Maladie des Muqueuses de l'Iowa auxquelles vient s'ajouter la Rhinotrachéite Infectieuse des bovins, maladies caractérisées par des altérations des muqueuses des tractus digestif et respiratoire.

Cet ensemble reçoit le nom de "Complexe Maladie des Muqueuses", en 1956 de l'AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE (90). Cette classification devient bientôt insoutenable du point de vue étiologique ; la Rhinotrachéite Infectieuse se sépare la première de cet ensemble (55) puis les différentes formes de la Diarrhée à Virus et la Maladie des Muqueuses se révèlent étiologiquement identiques. En effet, GILLESPIE et BAKER (30) rapportent en 1959 que les souches Indiana et New-York de la Diarrhée à Virus se révèlent identiques dans des épreuves d'immunisation croisée sur veaux ; de telles recherches étaient nécessaires car ces deux souches ne montraient aucun effet cytopathogène en cultures cellulaires (LEE et GILLESPIE 1957 - n° 52). En 1960 GILLESPIE et Coll. (31) isolent de la rate d'un veau atteint de Diarrhée à Virus dans l'Oregon, une souche cytopathogène qu'ils dénomment souche Oregon C24V, étroitement apparentée aux souches New-York et Indiana. En 1960, KNAZIEFF et PRITCHARD (47), puis en 1961 GILLESPIE et Coll. (32) démontrent par séroneutralisation croisée que la Diarrhée à Virus et la Maladie des Muqueuses sont la même maladie.

REPARTITION GEOGRAPHIQUE

La Maladie des Muqueuses, découverte aux U. S. A. a été par la suite identifiée dans de nombreux pays ; en Grande Bretagne (48), en Allemagne (48) (92), dans les Pays Scandinaves (9, 23, 38, 39, 75) et autres pays d'Europe. Des syndrômes comparables sont décrits en Australie (3), en Nouvelle Zélande (80), en Israël (61), en R. A. U. (46), en Inde (59, 64). PROVOST et Coll. de l'I. E. M. V. T. ont publié plusieurs travaux sur la Maladie des Muqueuses en Afrique Centrale (70, 71). En France, TOURNUT et Coll. (88) en 1961, puis CHARTON et Coll. (13) en 1963, l'identifient et pratiquent des infections expérimentales. Le Sud Ouest de

la France recèle un bon nombre de bovins infectés inapparents, en effet GILBERT (29) effectuant en 1967 une série de contrôles sérologiques par séroneutralisation constate l'existence d'un taux élevé de réponses positives.

HOTES NATURELS ET EXPERIMENTAUX

D'après le résultat des expériences de BAKER et Coll. (1) seuls les bovins sont considérés comme hôtes naturels du virus de la Maladie des Muqueuses. Cependant, BOEGEL (5) démontre que les moutons peuvent contracter la Maladie des Muqueuses en faisant une infection inapparente. TAYLOR et Coll. (86) établissent même que le virus se multiplie sur des foetus d'agneau après infection in utero. Le chevreuil peut également contracter la Maladie des Muqueuses (78). BAKER et Coll. fixent l'infection au lapin sans que celui-ci ne soit malade (1) ; le virus lapinisé est d'ailleurs utilisé comme vaccin.

EPIZOOTOLOGIE

La transmission de la Maladie des Muqueuses à l'intérieur d'une étable a été examinée en particulier par SCHIPPER et NOICE (85) ; ils utilisaient comme source de l'infection de la nourriture et de l'eau de boisson déjà en partie utilisées par des animaux malades. La contamination avait lieu sans exception et la maladie suivait le rang. Parfois on ne peut mettre en évidence aucun contact des animaux contaminés avec des malades ; dans ce cas on admet que le virus a été introduit dans l'étable par des bovins infectés latents. La Maladie des Muqueuses peut aussi survenir sous forme explosive dans une étable et atteindre la totalité des bovins de l'étable

en deux ou trois jours. HUCK (41) décrit un foyer dans lequel la Maladie des Muqueuses avait atteint les bovins âgés de 4 à 18 mois ; les animaux plus jeunes et plus âgés étaient épargnés. On ne peut pas savoir dans quelle mesure la non réceptivité est due à une résistance naturelle au virus, ou bien à l'immunité contre celui-ci. DINTER et Coll. (24) ainsi que BORGEN (11) trouvent des anticorps à un titre bas chez la plupart des animaux restés sains dans les étables atteintes. BAKER et Coll. (1) signalent que les jeunes veaux de moins d'un mois réagissent à peine à l'infection. PRITCHARD et Coll. (66) estiment que les bovins sont le plus réceptifs entre 8 mois et 2 ans et que les veaux de moins de 2 mois sont résistants. Parfois, la Maladie des Muqueuses est si bénigne que l'on ne la voit pas évoluer. RAMSEY et Coll. (74) pensent que l'on ne peut pas estimer la morbidité dans la Maladie des Muqueuses, alors que la mortalité s'élève habituellement à 5 %. L'aspect saisonnier de la Maladie des Muqueuses est sujet à controverses ; RAMSEY et CHIVERS (73) rapportent que la maladie sévit de préférence en hiver et au début du printemps en Grande Bretagne, par contre HUCK (41) prétend qu'elle y sévit toute l'année. DINTER et Coll. (24) ainsi que BORGEN (11) signalent des apparitions isolées de Maladie des Muqueuses pendant la saison froide en Suède et au Danemark ; les animaux étaient atteints aussi bien à l'étable qu'au pâturage.

La dissémination approximative de l'infection dans un pays peut être donnée par l'examen sérologique d'un nombre de bovins représentatif de chaque région du pays. C'est ce qu'ont fait NEWBERNE et Coll. (60) aux U. S. A., DINTER et BAKOS en Suède (23), BORGEN (11) au Danemark, LIEBERMANN (53) en Allemagne de l'Est, BOEGEL et Coll. (8) en Allemagne de l'Ouest, GILBERT (29) dans le Sud Ouest de la France. Le nombre de réponses sérologiques est assez élevé dans l'ensemble,

on peut même rencontrer des étables où la totalité des bovins réagissent positivement aux tests sérologiques sans que l'on ait pu relever l'évolution de Maladie des Muqueuses. Ceci prouve le nombre élevé d'infection inapparentes : 10 à 70 % des bovins selon les sondages sérologiques.

SYMPTOMES

La Maladie des Muqueuses se présente sous forme grave ou bénigne, son évolution est le plus souvent aigüe, parfois chronique. L'étude clinique de la Maladie des Muqueuses a fait l'objet de nombreuse publications, en particulier, celles d'OLAFSON et Coll. (62), de RAMSEY et CHIVERS (73), de BAKER et Coll. (1) de PRITCHARD et Coll. (65), de HUCK (41), de JARRET (44), de SCHIPPER et NOICE (85), et bien d'autres.

Dans la forme aigüe, l'incubation dure en moyenne 7 à 9 jours, ensuite surviennent les premières manifestations cliniques, fièvre élevée et leucopénie. La fièvre dure 2 à 5 jours, ensuite apparaissent les symptômes digestifs, salivation abondante et diarrhée intense qui peuvent persister plusieurs jours. A ce stade on remarque la présence d'érosions et d'ulcérations sur les lèvres, la langue, les gencives, le palais, parfois sur le muffle, les ailes du nez, la vulve, la peau de l'espace interdigité. Une cicatrisation rapide de ces lésions est exceptionnelle. Ces érosions ne sont jamais précédées de vésicules, ceci est important du point de vue diagnostic différentiel avec la Fièvre Aphteuse. Des symptômes respiratoires peuvent apparaître, en particulier un jetage muqueux puis mucopurulent et une toux sèche. Enfin apparaissent des symptômes généraux, anorexie, soif intense, abattement, amaigrissement, deshydratation, arrêt de la rumination, arrêt de la lactation chez

les femelles laitières ; des avortements peuvent survenir chez les femelles gestantes. Les signes nerveux font toujours défaut.

La Maladie des Muqueuses sous forme aigüe ne se présente pas toujours de cette façon là, les différences viennent du degré de gravité des symptômes (66). Le pronostic doit être établi avec précautions, la deshydratation est signe que la maladie prend une allure défavorable.

Les cas de Maladie des Muqueuses sous forme chronique ne sont pas rares, l'évolution de la maladie s'étale sur plusieurs semaines ou plusieurs mois avec des poussées aigües de fièvre et de diarrhée.

LESIONS

L'étude anatomopathologique de la Maladie des Muqueuses a également fait l'objet de nombreuses publications, les constatations nécropsiques variant beaucoup d'un foyer à un autre, d'un animal à un autre (73). Les publications de SEIBOLD (83), ROONEY (79), CARLSON et Coll. (12), JARRETT (44) fournissent une étude détaillée des lésions macroscopiques et histologiques.

On remarque en premier lieu l'état de deshydratation des cadavres ainsi que les modifications du tube digestif. Ce sont des érosions et des ulcérations que l'on trouve sur la muqueuse buccale et sur les muqueuses de l'oesophage et de la caillette, plus rarement sur les muqueuses des préestomacs. Ces érosions sont précédées d'élevures plus ou moins brunâtres. Le contenu des intestins est aqueux, d'odeur fétide, contenant souvent du sang coagulé. La muqueuse intestinale est congestionnée, oedématiée, on peut voir des érosions épithéliales et des pétéchies ; parfois les plaques de Peyer sont effondrées par disparition des cellules constitutives. Il arrive que les lésions intestinales soient infimes et n'expliquent en rien la diarrhée

intense. On retrouve souvent des érosions et des ulcérations sur la peau entre les onglons, sur les lèvres, sur la muqueuse nasale, dans le pharynx et dans le larynx. Le foie présente parfois des signes d'hypertrophie et de dégénérescence. Les processus purulents lorsqu'ils sont présents sont signe de complications bactériennes.

SEIBOLD (83) groupe les modifications histologiques en deux catégories, la première comprend les lésions nécrotiques, c'est-à-dire les érosions et les ulcérations de l'épithelium muqueux du tractus digestif antérieur. La deuxième catégorie comprend les lésions de l'ileon du caecum et du colon, c'est-à-dire les pétéchies et les ecchymoses provenant de troubles circulatoires au niveau de la lamina propria. L'epithelium glandulaire intestinal est aussi atteint par les troubles circulatoires qui entraînent une hyperproduction de mucus simulant une entérite nécrotique ou fibrinonécrotique.

LE VIRUS DE LA MALADIE DES MUQUEUSES

Le virus de la Maladie des Muqueuses n'est pas encore classé, on utilise souvent comme prototype la souche Oregon C24V (31). Ses caractéristiques physico-chimiques actuellement connues permettent de le rapprocher des Myxoviros, sans pour autant l'inclure au sein de ce groupe.

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES

GILLESPIE et Coll. (34) ont démontré que le virus de la Maladie des Muqueuses était sensible à l'éther. Selon HERMODSON et DINTER (40), la souche Oregon C24V est sensible à l'éther et au chloroforme, contient un acide ribonucléique et se trouve constitué de particules sphériques d'un diamètre d'environ 40 millimicrons. KNAZIEFF cité par PRITCHARD (69) estime que la taille du virus varie de 35 à 55 millimicrons. DIDERHOLM et DINTER (22) ont extrait l'acide ribonucléique du virus de la Maladie des Muqueuses, celui-ci s'est révélé posséder le pouvoir infectieux.

Le virus de la Maladie des Muqueuses est résistant au froid, il conserve son pouvoir pathogène après un séjour de 20 jours en glace carbonique (63), ainsi qu'après une série de congélations et de décongélations (26). Par contre, il est inactivé par la chaleur, après exposition de 15 minutes à 50°C il perd son pouvoir pathogène (89).

CULTURES

Le virus de la Maladie des Muqueuses se multiplie sur des cultures primaires de cellules rénales ou testiculaires de veau, avec ou sans effet cytopathogène. La multiplication du virus est relativement précoce, d'après GILLESPIE et Coll. (34) et d'après GUTEKUNST et MALMQUIST (37).

Les lésions cellulaires causées par les souches cytopathogènes sont assez caractéristiques, ce sont des foyers de dégénérescence dans lesquels les cellules ont un cytoplasme vacuolisé, granuleux, souvent rétracté et un noyau fortement pycnotique (31 et 38).

Les souches faiblement ou non cytopathogènes sont mises en évidence à l'aide de procédés indirects. Le premier procédé utilise le phénomène d'interférence homologue, dans une culture cellulaire où se développe une souche non cytopathogène de virus de la Maladie des Muqueuses, l'ensemensement d'une souche cytopathogène ne provoque pas l'apparition des lésions cellulaires caractéristiques (33). Le deuxième procédé applique la méthode E. N. D. mise au point par KUMAGAI et Coll. (50) pour la Peste Porcine, dans une culture cellulaire où se multiplie une souche non ou faiblement cytopathogène de virus de la Maladie des Muqueuses, l'ensemensement du virus de la Maladie de Newcastle provoque des lésions cellulaires. Cette méthode a été mise au point par INAHA et Coll. (43) en ce qui concerne la Maladie des Muqueuses. Les résultats positifs sont toujours vérifiés par séroneutralisation.

POUVOIR PATHOGENE

Les recherches de DOW et Coll. (26), ROONEY (79) et JARRETT (44) donnent un aperçu de la pathogénie de la Maladie des Muqueuses. Le virus provoque d'abord au niveau du stratum spinosum des foyers de dégénérescence ballonisante où les cellules sont caractérisées par une vacuolisation du cytoplasme accompagnée de pycnose nucléaire. La dégénérescence aboutit à la formation de microvésicules sur lesquelles le stratum corneum éclate. JARRETT (44) admet que l'ulcère microvésiculaire représente l'effet primaire du virus ; si le stratum cylindricum demeure intact, les érosions cicatrisent, mais habituellement celui-ci est détruit et une infection bactérienne secondaire se développe, provoquant la formation d'un ulcère nécrotique étendu au tissu conjonctif sous-jacent. D'après HANSEN (38) l'effet cytopathogène du virus se caractérise par une tendance des cellules parasitées à la rétraction et à la caryo-pycnose.

On ne trouve dans la littérature aucune opinion sur l'organotropisme du virus. Dans le but de rechercher ce tropisme, de nombreuses expériences de transmission expérimentale de la Maladie des Muqueuses ont été effectuées. BAKER et Coll. (1) inoculent le virus par voie intraveineuse à des veaux, après une incubation courte apparaissent fièvre et leucopénie évoluant le plus souvent de manière biphasique. Dans tous les cas, le virus était présent dans le sang jusqu'au 8e jour, avec un maximum au 4e jour. PRITCHARD et CARLSON (68) transmettent la Maladie des Muqueuses par différentes voies, orale, nasale, rectale et parentérale. L'incubation était de courte durée et les auteurs retrouvaient le virus dans le sang, la rate, les excréments, pendant toute la période fébrile.

De nombreuses autres infections expérimentales ont été réalisées. En France, CHARTON et Coll. (13), ainsi que TOURNUT et Coll. (88) se sont livrés à de tels essais, ils aboutissent à des conclusions semblables.

La maladie expérimentale évolue en règle générale de façon bénigne, que la suspension d'organe inoculée provienne d'animaux atteints par une forme grave ou bénigne de la Maladie des Muqueuses (41).

La véritable porte d'entrée du virus demeure cependant inconnue, de même les facteurs influant sur le caractère de la maladie. Un fait est remarquable, on ne décèle aucun anticorps anti-maladie des Muqueuses dans le sérum des animaux malades lors d'évolution chronique de la maladie, bien que l'on puisse encore isoler le virus dans les prélèvements au bout de 2 mois d'infection (11 et 87).

POUVOIR ANTIGENE

L'antigène du virus de la Maladie des Muqueuses

Après individualisation de la souche Oregon C24V (31), divers auteurs lui ont comparé par séroneutralisation des souches de virus isolées à partir d'animaux atteints de Maladie des Muqueuses. Certaines souches se sont révélées étroitement apparentées à la souche C24V, alors que d'autres souches en diffèrent passablement.

Selon GUTEKUNST et MALMQUIST (35, 36, et 37), le virus de la Maladie des Muqueuses contient deux antigènes. Le premier est lié à la particule infectante et induit l'apparition d'anticorps neutralisants. Dans les tests de séroneutralisation, ces anticorps ont un titre plus élevé contre une souche homologue que contre une souche hétérologue.

Le deuxième antigène est soluble, il induit l'apparition d'anticorps précipitants ; chez les animaux infectés expérimentalement, les anticorps précipitants peuvent être décelés plus tôt que les anticorps neutralisants. De même, dans les cultures cellulaires du virus, pendant la phase de multiplication de celui-ci, l'antigène soluble apparaît plus tôt que la particule infectante.

Rapports antigéniques avec le virus de la Peste Porcine

DARBYSHIRE (17 et 20) a démontré par précipitation en milieu gélifié que les antigènes provenant d'organes de bovins atteints de Maladie des Muqueuses et de porcs atteints de Peste Porcine sont apparentés les uns aux autres. Cette parenté antigénique concerne les antigènes solubles des deux virus (35, 36 et 72). MENGELING et Coll. (58) démontrent également cette parenté antigénique par Immunofluorescence. KUMAGAI et Coll. (51), ainsi que DINTER (25) prétendent, qu'il existe une parenté antigénique partielle entre les antigènes qui induisent les anticorps neutralisants. On peut ainsi expliquer le fait que des porcelets inoculés par le virus de la Maladie des Muqueuses se montrent ultérieurement immunisés vis à vis de la Peste Porcine (2, 21 et 84). Cette parenté antigénique même partielle des antigènes induisant les anticorps neutralisants est contestée par SHEFFY et Coll. (84), COGGINS et SEO (15), GUTEKUNST et MALMQUIST (35 et 36). SHEFFY et Coll. (84) démontrent d'ailleurs que les porcelets infectés par la Maladie des Muqueuses réagissent à l'inoculation du virus de la Peste Porcine par une apparition accélérée d'anticorps neutralisant les deux virus. Cette propriété antigénique est utilisée à grande échelle aux U. S. A. où l'on vaccine les porcs contre la Peste Porcine par le virus de la Maladie des Muqueuses.

Certains auteurs ont voulu aller plus loin et voir s'il n'existait pas une parenté physicochimique des deux virus. Selon DINTER (25) et LOAN (54) le virus de la Peste Porcine est comme le virus de la Maladie des Muqueuses un ribovirus sensible à l'éther. D'après MAYR (57), le virion suipestique possède des dimensions comparables à celles du virion de la Maladie des Muqueuses.

L'immunité dans la Maladie des Muqueuses

Les animaux guéris de la Maladie des Muqueuses sont immunisés contre celle-ci, mais l'immunité n'est peut-être pas toujours durable. Selon HUCK (41), on peut assister à des récidives, en particulier lors d'infection expérimentale d'animaux guéris. La plupart des chercheurs ont cependant établi une solide résistance aux réinfections.

ROBSON et Coll. (76) en particulier ont examiné par séroneutralisation des sérums de veaux infectés expérimentalement. Le jour de l'infection, les sérums étaient dépourvus d'anticorps neutralisants, ceux-ci apparaissent en moyenne vers le 14e jour après l'infection pour augmenter jusqu'au 28e jour ; tous les animaux possesseurs d'anticorps neutralisants se révèlèrent immunisés contre une seconde infection, ce qui fit considérer le test de séroneutralisation comme un indicateur précis de l'immunité par ces mêmes auteurs. Le test de séroneutralisation fut d'ailleurs standardisé par COGGINS (16) pour la Maladie des Muqueuses.

Par passages en série sur lapin (1), ou sur cultures de cellules (14), le virus de la Maladie des Muqueuses perd son pouvoir pathogène pour les bovins, tout en conservant son pouvoir immunigène. De tels virus atténués sont utilisés à grande échelle aux U. S. A. pour la vaccination des bovins contre la Maladie des Muqueuses.

L'IMMUNOFLUORESCENCE DANS LA MALADIE DES MUQUEUSES

AVANT_PROPOS

Au cours de notre 4,e année d'études à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, nous avons participé aux travaux effectués au Service de Maladies Contagieuses sur l'Immunofluorescence dans la Maladie des Muqueuses des bovins. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication de SAURAT et Coll. (82). Depuis 1961, plusieurs dizaines de cas de Maladie des Muqueuses ont été observés dans la région toulousaine, permettant l'isolement de plusieurs souches de virus qui se sont révélées régulièrement cytopathogènes en cultures de cellules rénales bovines. L'identification du virus se fait en règle générale par séroneutralisation. Il existe cependant des souches non cytopathogènes qui ne pourraient être identifiées par ce procédé ; leur mise en évidence est liée à l'inoculation au bovin ou à l'utilisation in vitro de procédés délicats tels que l'interférence avec une souche cytbpathogène (33 et 71), la méthode E. N. D. (50) adaptée par INAHA et Coll. à la Maladie des Muqueuses (43), ou encore la recherche de l'antigène précipitant (19 et 71).

Dans ces conditions, il a paru intéressant de rechercher si la technique d'Immunofluorescence était applicable au diagnostic de la Maladie des Muqueuses, soit en facilitant la mise en évidence et l'identification du virus, soit en révélant les anticorps spécifiques dans le sérum des animaux infectés. C'est dans ce double but que la technique d'Immunofluorescence indirecte a été utilisée. La technique d'Immunofluorescence directe a déjà été employée par plusieurs auteurs, en particulier FERNELUS (27) FERNELUS et RITCHIE (28), KOKLES et Coll. (49), MALMQUIST et Coll. (56), MENGELING et Coll. (58).

Pour les données relatives à l'Immunofluorescence en général, nous nous sommes référés à l'article de SAURAT et CHANTAL (81) paru dans la Revue de Médecine Vétérinaire.

TECHNIQUE GENERALE

Nous avons utilisé des cultures de cellules rénales bovines de première explantation, âgées de 48 heures au moment de l'inoculation par le virus de la Maladie des Muqueuses. Le sérum anti-Maladie des Muqueuses (anti-M. M.) a été récolté sur deux veaux de 6 mois inoculés, l'un avec la souche de référence Oregon C24V, l'autre avec une souche (F. V.) isolée au laboratoire de Maladies Contagieuses de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse : les sérums ont été récoltés 45 jours et 4 mois après l'inoculation et sont conservés au congélateur à - 20°C. Après culture du virus à l'étuve à 37°C, les lamelles support des cultures cellulaires sont lavées par une solution tampon physiologique et fixées à l'acétone.

L'opération se déroule alors en quatre temps :

1) Sérum anti-M. M. : il agit sur la culture virulente pendant 30 minutes à la température de 37°C.

2) Lavage par la solution tampon physiologique pendant 20 minutes.
La formule du tampon est la suivante

NaCl.....	8 g
PO_4HNa_2, 12 H_2O	2,7 g
PO_4H_2Na, 2 H_2O.....	0,4 g
eau distillée.....	1 litre

3) Sérum anti-globulines bovines :

c'est un sérum fluorescent de lapin anti-globulines bovines, préparé par l'Institut Pasteur. Il est dilué au 1/50 et agit sur la préparation pendant 20 minutes à 37°C.

4) Lavage par la solution tampon physiologique pendant 20 minutes.

Les lamelles sont ensuite séchées, collées sur des lames par de l'Entellan (N. D. BAYER) puis examinées au microscope à fluorescence.

PLAN D'ETUDE

Après quelques expériences préliminaires destinées à voir si la réaction était aisément interprétable, nous nous sommes tournés vers l'étude de diverses composantes de la réaction en vue de son amélioration technique.

Nous avons regroupé les expériences sous diverses rubriques, en ne perdant pas de vue les buts recherchés, d'une part la recherche et l'identification du virus en culture cellulaire, d'autre part la mise en évidence des anticorps dans le sérum des animaux infectés.

1) Recherche du virus

- Réactions préliminaires
- Etude de la fixation des cultures cellulaires
- Dilution optimum du sérum anti-M. M.
- Influence de l'absorption du sérum anti-M. M. par des poudres de cellules.
- Essais de la réaction d'immunofluorescence sur des cultures du virus sur des cellules autres que les cellules rénales bovines.
- Spécificité de la réaction :
    . Réaction d'extinction spécifique de la fluorescence
    . Comparaison avec d'autres virus
- Etude comparative de différentes souches du virus de la M. M.
- Délais d'apparition de la fluorescence
- Essai de titrage du virus

2) Recherche des anticorps

- Diagnostic de l'infection
- Cinétique des anticorps.

REACTIONS PRELIMINAIRES

But

Nous avons effectué une première série d'expériences sur deux séries de préparations, les premières sont des lamelles portant des cultures virulentes, les secondes sont des témoins négatifs. Le but de l'opération est de voir si les cellules infectées présentent une fluorescence spécifique et si les cultures non ensemensées ne présentent aucune fluorescence spécifique.

Réalisation pratique

Nous avons utilisé des cultures de cellules rénales bovines inoculées par la souche Oregon C24V et fixées dans l'acétone à - 20°C après 48 et 72 heures de culture. Le sérum anti-M. M. est utilisé aux dilutions 1/10, 1/50, 1/250. L'opération se fait en 4 temps comme il est exposé au chapitre précédent.

Résultats

Après quelques tâtonnements, nous avons obtenu des résultats satisfaisants, c'est-à-dire la présence de fluorescence spécifique dans les cellules infectées par le virus M. M. et l'absence de fluorescence spécifique dans les préparations témoins.

Les tableaux suivants donnent le détail des résultats :

1) Cultures de cellules infectées :

dose de virus inoculée / fixation / dose de sérum anti-M. M.	virus non dilué		virus dilué	
	après 48 h	après 72 h	après 48 h	après 72 h
1/10	+	+	+	+
1/50	+	+	+	+
1/250	+	+	+	+
	résultats			

2) Cultures témoins sans virus :

dose de virus inoculée / fixation / dose de sérum anti-M. M.	0
	après 48 h
1/10	0
1/50	0
1/250	0
	résultats

3) Cultures de cellules infectées, témoins du sérum antiglobulines :

dose de sérum anti-M.M.	virus non dilué fixé après 48 heures
0	0
	résultats

Les résultats de ces expériences préliminaires ont été classés simplement en résultats positifs (+) et en résultats négatifs (0).

Aspect de la fluorescence en microscopie

Au microscope, au faible grossissement, la fluorescence apparaît jaune verdâtre dans des cellules ou des groupes cellulaires envahis par le virus M. M., irrégulièrement dispersés dans une nappe cellulaire à peine visible. La fluorescence est cytoplasmique, elle débute en région périnucléaire puis s'étend à tout le cytoplasme.

A l'immersion, la fluorescence apparaît homogène, soit finement granulaire, soit sous forme de condensations cytoplasmiques, soit sous forme de vacuoles sombres à périphérie fluorescente.

Conclusion

Ayant obtenu une réaction apparemment satisfaisante, nous l'avons analysée, en vue de l'améliorer pour la rendre utilisable dans la pratique du diagnostic de la Maladie des Muqueuses.

Nous avons aussi effectué des essais de "réaction en tube", dans lesquelles le sérum anti-M. M. était ajouté directement dans les tubes de culture (après élimination du milieu de culture, rinçage et fixation des cultures), au lieu d'être déposé sur les lamelles comme précédemment. Nous avons dû renoncer à cette façon de procéder, les résultats n'étant pas satisfaisants.

ETUDE DE LA FIXATION DES CULTURES CELLULAIRES

Nécessité de la fixation

Nous nous sommes demandé si la fixation des cultures virulentes était vraiment nécessaire et si l'on ne pouvait pas simplifier la technique en supprimant ce temps opératoire.

En pratique, nous utilisons des cultures de cellules rénales bovines inoculées après 48 heures de culture par 1000 D.C.P. 50 % de virus Oregon. Après 48 heures de culture du virus à l'étuve à 37°C, les lamelles sont lavées par la solution tampon physiologique et séparées en deux groupes. Les préparations du 1er groupe sont fixées par de l'acétone à - 20°C, celles du second groupe ne sont pas fixées. Le sérum anti-M. M. est utilisé aux dilutions 1/10 et 1/50. Un 3e groupe est constitué par les préparations témoins sans virus traitées les unes après fixation par l'acétone, les autres sans fixation préalable.

Résultats :

La fluorescence est la même du point de vue intensité et nombre de foyers fluorescents, sur les lames fixées ou sur les lames non fixées, pour une même dose de sérum anti-M. M. Cependant l'interprétation des résultats est plus difficile sur les lames non fixées, du fait de la disparition d'une grande partie de la nappe cellulaire emportée par les lavages successifs.

Conclusion :

La fixation est nécessaire à une interprétation correcte des résultats.

Choix du fixateur

Après avoir utilisé l'acétone comme fixateur habituel, nous avons essayé d'autres procédés de fixation pour rechercher lequel était le meilleur. Dans ce but, nous avons utilisé des cultures de cellules rénales de foetus de veau inoculées après 48 heures de culture par 1000 D.C.P. 50 % de virus Oregon. Toutes les préparations sont traitées par la même dose de sérum anti-M. M., seule la technique de fixation diffère.

Procédés de fixation :

- acétone à - 20°C pendant 15 minutes (séries V_1 = virus et T_1 = témoins)
- alcool à 95° pendant 2 minutes (séries V_2 et T_2)
- alcool méthylique pendant 2 minutes (séries V_3 et T_3)
- formol dilué au 1/100 en solution tampon physiologique puis acétone à - 20°C (séries V_4 et T_4)

Résultats :

Les préparations V_1, V_2, V_3 et V_4 présentent de la fluorescence spécifique, les témoins T_1, T_2, T_3 et T_4 sont négatifs. Cependant, la fluorescence spécifique est plus faible sur les préparations des séries V_2, V_3, V_4 que sur celles de la série V_1.

Conclusion :

La fixation à l'acétone est la meilleure de celles que nous avons utilisées, elle paraît s'imposer pour la suite des expériences. Nous l'avons donc adoptée.

Modalité de la fixation à l'acétone

Nous avons toujours employé une fixation à l'acétone d'une durée de 15 minutes, qui intervenait, après lavage préalable, juste après avoir retiré les lamelles des tubes de culture. Nous avons essayé deux autres modalités pour comparer les résultats. Les cultures de cellules rénales de foetus de veau sont inoculée par 1000 D.C.P. 50 % de virus Oregon, le sérum anti-M. M. est dilué au 1/25.

Procédés de fixation :

- acétone à - 20°C pendant 1 heure, puis 48 heures à l'obscurité à la température ambiante avant la coloration.
- acétone à - 20°C pendant 48 heures et coloration aussitôt après.

(chaque série de préparation a ses témoins sans virus correspondant).

Résultats :

semblables dans les deux séries, les témoins sont négatifs.

Conclusion :

La durée et l'ancienneté de la fixation à l'acétone n'interviennent pas dans le rendement de la réaction, dans les limites fixées à 48 heures. Que la fixation soit de courte durée ou de longue durée, qu'elle soit ancienne ou récente par rapport à la coloration, les résultats sont les mêmes. En pratique, nous avons utilisé pour les expériences qui suivent une fixation par l'acétone à - 20°C de durée et d'ancienneté variables, suivant les possibilités du moment.

DILUTION DU SERUM ANTI MALADIE DES MUQUEUSES

But et réalisation pratique de l'expérience

Au cours des premiers essais, nous avons utilisé le sérum anti-M. M. à diverses dilutions, or l'interprétation des résultats s'en faisait ressentir, se révélant plus aisée pour certaines concentrations. Au cours d'une expérience nous avons comparé les résultats obtenus avec plusieurs dilutions de sérum anti-M. M. Nous Nous sommes servi de cultures de cellules rénales bovines inoculées par 1000 D.C.P. 50 % de virus Oregon et fixées 48 heures plus tard. Nous avons préparé des séries de lamelles correspondant aux dilutions 1/5, 1/10, 1/25, 1/50 et 1/100 du sérum anti-M. M., chaque série possédant ses témoins sans virus correspondant.

Résultats

La dilution optimum est la dilution 1/50. Aux faibles dilutions (1/5, 1/10 et 1/25) nous avons observé beaucoup de fluorescence non spécifique, à de trop fortes dilutions (1/100 et au delà) la réaction est difficile à déceler.

INFLUENCE DE L'ADSORPTION DU SERUM ANTI MALADIE DES MUQUEUSES PAR DES POUDRES DE CELLULES

But

En vue d'éliminer la fluorescence non spécifique, nous avons effectué des essais d'adsorption du sérum anti-M. M. par des poudres de cellules. L'adsorption doit, en principe, éviter la fixation non spécifique du sérum anti-M. M. sur la nappe cellulaire, éliminant ainsi tout risque de fluorescence parasite.

Réalisation pratique

Pour adsorber le sérum anti-M. M., nous mélangeons dans un mortier 3 ml. de sérum dilué au 1/10 et environ 100 mg. de poudre de cellules rénales de veau ou de poudre de foie de veau. Nous laissons reposer 15 minutes à la température ambiante et nous ajoutons 12 ml. de solution tampon physiologique, ce qui porte la dilution au 1/50. Nous filtrons sur papier et nous recueillons le filtrat que nous utilisons. La poudre de cellules rénales est obtenue par trypsination et centrifugation de rein de veau, la purée ainsi obtenue étant lavée 4 fois à l'acétone et séchée. La poudre de foie de veau est obtenue par broyage, lavages à l'acétone et séchage.

Cinq séries de lamelles ont été préparées, à chaque série correspond un témoin négatif :

- série A : sérum anti-M. M. non adsorbé et dilué au 1/50
- série B : sérum anti-M. M. adsorbé par de la poudre de cellules rénales et dilué au 1/25

- série C : sérum anti-M. M. adsorbé par de la poudre de cellules rénales et dilué au 1/50
- série D : sérum anti-M. M. adsorbé par de la poudre de foie et dilué au 1/25
- série E : sérum anti-M. M. adsorbé par de la poudre de foie et dilué au 1/50

Résultats

La fluorescence spécifique s'apprécie le mieux dans les préparations des séries C et E. La dilution optimum est bien la dilution 1/50, ceci rejoint les conclusions du chapitre précédent. L'adsorption du sérum anti-M. M. par la poudre de cellules rénales ou par la poudre de foie donne les mêmes résultats.

Conclusion

L'adsorption du sérum anti-M. M. permet d'éliminer en partie la fluorescence non spécifique et facilite ainsi la lecture des résultats. Pour la suite des expériences, le sérum anti-M. M. a toujours été utilisé adsorbé par l'un ou l'autre des deux procédés, suivant les possibilités.

ESSAIS DE LA REACTION D'IMMUNOFLUORESCENCE SUR DES CULTURES DU VIRUS SUR CELLULES AUTRES QUE LES CELLULES RENALES BOVINES

1) Culture du virus M. M. (souche Oregon et souche F. V) sur cellules rénales d'agneau

Réalisation pratique

Après 4 jours de culture, des cultures de cellules rénales d'agneau sont ensemensées par 1000 D.C.P. 50 % de virus Oregon ou par la dilution 1/20 de culture de virus F. V. Les cultures sont fixées et colorées au bout de 48 heures. Le sérum anti-M.M. est adsorbé sur poudre de cellules et dilué au 1/50. Chaque série de préparation a ses témoins négatifs correspondant.

Résultats

Les préparations comprenant des cultures virulentes sont fluorescentes, les préparations témoins sont négatives. La fluorescence est moins intense par rapport à celle obtenue lors de culture du virus sur cellules rénales bovines.

Conclusion

Lorsque cela est possible, il vaut mieux utiliser des cultures de cellules rénales bovines pour réaliser des expériences d'immunofluorescence en matière de Maladie des Muqueuses. Cependant, on peut se servir de cultures de cellules rénales d'agneau lorsque les premières font défaut, la réaction sera simplement moins intense.

2) Essai de culture du virus M. M. (souche F. V.) sur cellules rénales de porc

Réalisation pratique

1000 D.C.P. 50 % de virus F. V. ont été ensemensées sur des cultures de cellules rénales de porc. La fixation et la coloration ont eu lieu après 36 heures de culture, le sérum anti-M. M. est adsorbé sur poudre de cellules et dilué au 1/40.

Les résultats sont négatifs.

Conclusion

Nous n'avons pas pu utiliser des cultures de cellules rénales de porc pour réaliser des expériences d'immunofluorescence en matière de Maladie des Muqueuses, contrairement à ce qu'ont réalisé MENGELING et Coll. (58), avec un virus qu'ils avaient au préalable, il est vrai, adapté aux cellules porcines.

SPECIFICITE DE LA REACTION

Après avoir mis au point la technique de fixation des cultures cellulaires et recherché la dose optimum de sérum anti-M. M., après avoir cherché à éliminer la fluorescence parasite, c'est-à-dire non spécifique, nous avons voulu voir jusqu'à quel point la réaction était spécifique. Dans ce but deux groupes d'expériences ont été réalisés, la réaction d'extinction spécifique et l'examen comparatif d'autres virus.

1) Réaction d'extinction spécifique

Principe

Le sérum anti-M. M. "saturé" par le virus de la Maladie des Muqueuses ne doit pas permettre la fixation des antiglobulines fluorescentes sur les cellules hébergeant le virus.

Réalisation pratique

Nous disposons deux séries de préparations.

- série A : les lames sont préparées selon la technique classique.
- série B : le sérum anti-M. M. est "saturé" par addition de 10 fois son volume de milieu de culture fraîchement récolté.

Résultats

Alors que les lames de la série A sont positives, les lames de la série B sont faiblement positives ou négatives. Le contact sérum-virus bloque donc une grande partie des globulines anticorps qui ne peuvent se fixer sur les cellules parasitées par le virus. On peut dire que la fluorescence est amoindrie ou éteinte de façon spécifique.

2) Examen comparatif d'autres virus

Principe

Nous avons comparé dans des réactions d'immunofluorescence croisée le virus de la Maladie des Muqueuses, le virus de la Rhinotrachéite Infectieuse des bovins (virus R. T.) et un entérovirus.

- le virus R. T. est inoculé à la dose de 1000 D.C.P. 50 % sur des cultures de cellules rénales bovines fixées 24 heures après l'inoculation

- le virus M. M. est inoculé à la dose de 1000 D.C.P. 50 % sur des cultures de cellules rénales bovines fixées 36 heures après l'inoculation

- l'enterovirus (isolé au laboratoire de Maladies Contagieuses de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) est inoculé sur cultures de cellules rénales bovines fixées 24 heures après l'inoculation.

(Les préparations témoins sont fixées après 36 heures de culture).

Les différents sérums sont utilisés à des dilutions variables :

- le sérum anti-R. T. est adsorbé par de la poudre de cellules rénales et dilué au 1/10, 1/25 et 1/50.
  (son titre neutralisant est supérieur au 1/25 et n'a pas été précisé au delà)

- le sérum anti-M. M. est adsorbé et dilué aux 1/10 et 1/50.

- le sérum anti-enterovirus est dilué aux 1/5, 1/10, 1/25 et 1/50

Réalisation pratique

sérums	anti-M. M.		anti-R. T.			anti-enterovirus			
dilution / virus	1/10	1/50	1/10	1/25	1/50	1/5	1/10	1/25	1/50
M. M.	A	B	C	D	E	F	G	H	I
R. T.	1	2	3	4		5	6		
enterovirus		I	II			III	IV		

Résultats

a) Préparations du virus M. M. : A, B, C, D, F, G, H sont positives
E et I sont négatives

b) Préparation du virus R. T. : 1 et 2 sont négatives
3, 4, 5 et 6 sont positives
(la lecture est rendue difficile par une importante destruction cellulaire)

c) Préparation de l'enterovirus : I est négative,
II, III, IV sont positives
(les témoins sont négatifs)

Commentaire

- le sérum anti-M. M. marque seulement le virus M. M.
- le sérum anti-R. T. marque le virus R. T. mais aussi le virus M. M. et l'enterovirus à de faibles dilutions. Ce phénomène doit être lié à la présence d'anticorps anti-M. M. dans le sérum anti-R. T. qui est un sérum de bovin tout venant.
- le sérum anti-enterovirus contient des anticorps anti-M. M. mis en évidence aux dilutions 1/5, 1/10 et 1/25. Il est à noter que la séroneutralisation n'a pas révélé dans ce sérum d'anticorps neutralisant le virus M. M.

Conclusion

Malgré les critiques qui s'attachent à ces résultats, il ne semble pas y avoir de réaction croisée entre les anticorps anti-M. M., le virus R. T. et un enterovirus. La réaction d'Immunofluorescence indirecte dans le cadre de la Maladie des Muqueuses semble donc spécifique. D'autre part, il existe une nette différence entre la fluorescence des cellules hébergeant le virus M. M. et la fluorescence des cellules hébergeant le virus R. T.

EXAMEN COMPARATIF DE DIFFERENTES SOUCHES DU VIRUS DE LA MALADIE DES MUQUEUSES

But

En vue de voir si l'immunofluorescence était applicable au diagnostic de tous les cas de Maladie des Muqueuses, nous avons effectué des examens comparatifs du virus Oregon, souche de référence, avec d'autres souches de virus M. M. isolées au laboratoire de Maladies Contagieuses de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Réalisation pratique

Les différentes souches de virus M. M. sont ensemensées sur des cultures de cellules rénales bovines fixées 48 heures plus tard.

Le tableau suivant donne les résultats :

virus Oregon C24V	+++
virus F. V.	+++
virus M. M. 1	++
virus M. M. 2	+
virus M. M. 3	+++
virus M. M. 4	+++
virus M. M. 5	+++
virus M. M. 5	++

légende : +++ fluorescence intense par foyers confluents dans tous les champs du microscope

++ présence de nombreux foyers de cellules fortement fluorescentes

+ présence de quelques foyers de cellules fluorescentes

Conclusion

Tous les virus qui provenaient de cas de Maladie des Muqueuses et que nous avons examinés, ont été révélés et identifiés par l'Immunofluorescence. Les variations de l'intensité de la fluorescence sont peut-être en relation avec la quantité de virus ensemensée et avec la variabilité antigénique des diverses souches.

Il est intéressant de rapporter à ce propos les résultats obtenus par immunofluorescence croisée entre les deux souches Oregon et F. V. Les titres indiqués dans le tableau qui suit correspondent aux dilutions maxima révélant la fluorescence provoquée par les souches homologue et hétérologue.

	sér. anti Oregon	sér. anti F. V.
virus Oregon	1/160	1/320
virus F. V.	1/160	1/640

Le sérum anti Oregon possède un titre identique vis à vis d'une culture homologue et hétérologue, alors que le sérum anti F.V. plus riche en anticorps, marque mieux la souche homologue que la souche hétérologue. Cette différence, bien sûr très légère, plaide dans le sens d'une légère variabilité dans la structure antigénique du virus de la Maladie des Muqueuses. Ceci rejoint les résultats qu'avait obtenus FERNELIUS (27) en séroneutralisation et en Immunofluorescence directe.

DELAIS D'APPARITION DE L'IMMUNOFLUORESCENCE

But

En fonction de la dose d'inoculation du virus M. M., nous avons recherché quels étaient les délais d'apparition de la fluorescence dans les cellules hébergeant le virus.

Réalisation pratique

Les cultures de cellules rénales bovines ont été inoculées par 10, 100 et 1000 D.C.P. 50 % de virus Oregon (les mêmes expériences ont été réalisées avec le virus F.V. et donnent des résultats similaires).

Les cultures sont fixées 24, 48 et 72 heures après l'inoculation.

Résultats

dose de virus inoculée	fixation		
	après 24 h.	après 48 h.	après 72 h.
10 DCP 50 %	0	+	++
100 DCP 50 %	+	++	+++
1000 DCP 50 %	++	+++	++++

légende

0	pas de fluorescence perceptible
+	rares foyers fluorescents
++	1 foyer pour 2 - 3 champs
+++	1 à plusieurs foyers par champ
++++	foyers fluorescents confluents avec début de destruction cellulaire

Conclusion

Une faible quantité de virus ensemensée n'est pas décelée en 24 heures, mais mise en évidence en 48 - 72 heures. Une forte quantité de virus est révélée en 24 heures.

Comparaison avec l'immunofluorescence dans le cas de la Rhinotrachéite

Il nous a paru intéressant de rapporter ici les résultats obtenus dans des expériences comparables concernant la Rhinotrachéite Infectieuse des bovins.

dose de virus inoculée	fixation après 14 h.	fixation après 24 h.	fixation après 36 h.
10 DCP 50 %	++	++	+++
100 DCP 50 %	+	+++	++++
1000 DCP 50 %	+++	++++	++++

Dans les cultures âgées de 36 heures et dans les cultures inoculées par 1000 D.C.P. 50 % de virus R.T., la destruction cellulaire est très importante.

L'aspect qualitatif de la fluorescence n'est appréciable que sur des cellules très jeunes fixées 14 heures après l'inoculation du virus R.T.

Nous avons pu voir trois étapes dans l'apparition de la fluorescence :

- au début, la fluorescence est nucléaire, d'abord diffuse puis localisée à la périphérie du noyau
- ensuite, la fluorescence diffuse à toute la cellule
- enfin, les cellules dégénèrent et deviennent intensément fluorescentes, sans détail de structure interne.

ESSAI DE TITRAGE DU VIRUS

But

Nous avons voulu vérifier la possibilité d'un titrage du virus M. M. par dénombrement des plages fluorescentes, comme cela a déjà été réalisé pour d'autres maladies à virus, en particulier la Peste Porcine et la Maladie de Newcastle.

Réalisation pratique

Quatre séries de tubes à lamelles sont inoculés par des quantités croissantes d'une suspension de virus Oregon titrant $10^{-6,5}$. L'immunofluorescence est pratiquée après 24 heures de culture virulente et nous comptons le nombre de plages fluorescentes sur chaque lamelle. Les résultats sont donnés par le tableau suivant :

série de tubes à lamelles inoculée	quantité de virus théoriquement inoculée	nombre moyen de plages fluorescentes	titre obtenu en I. F.
A	$0,2 . 10^{-7}$ (moins d'un virion)	0	
B	$0,2 . 10^{-6}$ (à peu près 3 virions)	0	
C	$0,2 . 10^{-5}$ (à peu près 30 virions)	3	$3 . 0,2 . 10^{-5} = 0,6 . 10^{-5}$
D	$0,2 . 10^{-4}$ (à peu près 300 virions)	25	$25 . 0,2 . 10^{-4} = 5 . 10^{-4}$

Conclusion

Il existe une correlation entre la quantité de virus ensemensée et le nombre de foyers fluorescents au bout de 24 heures de culture. Les chiffres sont cependant plus faibles que le titre réel fixé par la méthode des dilutions avec appréciation de l'effet cytopathogène au 4e jour. La possibilité d'un titrage est confirmée, mais celui-ci devra exiger un nombre de tubes plus grand et un dénombrement précis des plages au microscope sur de nombreuses lamelles.

MISE EN EVIDENCE DES ANTICORPS

I - En vue du diagnostic sérologique de l'infection

Nous avons examiné à l'aide de cultures du virus F. V. (ensemensé à des doses supérieures à 1000 D.C.P. 50 % sur cultures de cellules rénales âgées de 24 heures et fixées 36 heures après l'inoculation) , des sérums de bovins positifs ou négatifs en séroneutralisation (16 positifs et 9 négatifs).

Résultats

- les 16 sérums positifs en séroneutralisation étaient positifs en immunofluorescence à des titres allant du 1/10 au 1/100.

- les 9 sérums négatifs étaient négatifs en immunofluorescence au 1/5.

II - Cinétique des anticorps

Nous avons recherché la cinétique des anticorps anti Maladie des Muqueuses des sérums de 2 veaux inoculés, l'un avec la souche Oregon (veau LOU), l'autre avec la souche F. V. (veau 071).

Résultats

date	LOU	071
5e jour	0	0
7e jour	+ à 1/2,5	
9e jour	+ à 1/5	
10e jour	+ à 1/10	+ à 1/10
11e jour	+ à 1/10	
13e jour	+ à 1/20	
15e jour	+ à 1/40	+ à 1/80
17e jour	+ à 1/80	
20e jour	+ à 1/160	
24e jour	+ à 1/160	+++ à 1/160
45e jour	+ à 1/320	

(les titres indiqués dans le tableau correspondent aux dilutions maxima révélant la fluorescence)

En moyenne, la possibilité d'un titrage des anticorps par Immunofluorescence s'affirme dès le 9e - 10e jour. Les anticorps augmentent progressivement et atteignent un taux élevé après un à quatre mois. Ceci rejoint les résultats de BOEGEL et VOSS (8).

CONCLUSIONS GENERALES

La méthode d'Immunofluorescence indirecte est une technique applicable à l'étude de la Maladie des Muqueuses ; elle est susceptible d'être utilisée pour le dépistage et le diagnostic :

- soit en visualisant de façon précoce le virus mis en cultures de cellules rénales bovines, ou ce qui serait mieux, directement dans les tissus de l'animal malade,

- soit en mettant en évidence les anticorps spécifiques dans le sérum des animaux malades ou suspects.

BIBLIOGRAPHIE

1) BAKER (J. A.), YORK (C. J.), GILLESPIE (J. H.) et MITCHELL (G. B.) 1954. Diarrhée à Virus chez des bovins. Am. J. Vet. Res. 14, 525.

2) BECKENHAUER (W. H.), BROWN (A. L.), LIDOLPH (A. A.) et NORDEN (C) 1961. Immunization of swine against Hog Cholera with a bovine enterovirus. Vet. Med., 56, 108.

3) BLOOD (D. C.), HUTCHINS (D. R.), JUBB (K. V.), WHITTEM (J. H.) et LITTLEJOHNS (I). 1957. Mucosal Disease of cattle in Australia. Austral. Vet. J., 33, 75.

4) BOEGEL (K.) 1963. Vergleichende Untersuchungen ueber die Verbreitung des Diarrhoe Virus und Parainfluenza 3 Virus bei Rindern in Suedwestdeutschland. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr., 6, 101.

5) BOEGEL (K.) 1964. Spread of avirus of the Mucosal Disease group in sheep flocks in Southern Germany. Zentbl. Vet. Med., 11 (B), 687.

6) BOEGEL (K.) 1964. Suitability of the disk test for the diagnosis of Mucosal Disease. Zbl. Bakt., 193, 34.

7) BOEGEL (K) et NEUMANN (H. J.) 1964. Investigation of a possible relationship between Mucosal Disease virus and Bovine Leucosis. Zentbl. Vet. Med., 11 (B), 11.

8) BOEGEL (K.) et VOSS (H. J.) 1964. Serological studies of the incidence of Mucosal Disease virus in cattle in Nordgermany. Zentbl. Vet. Med. 11 (B), 181.

9) BORGEN (H. C.) et DINTER (Z.) 1961. Mucosal Disease in Denmark. Nord. Vet. Med., 13, 644.

10) BORGEN (H. C.) 1963. Mucosal Disease in Denmark, relationship of Viral Diarrhea to the spontaneous and experimental disease. Nord. Vet. Med., 15, 409.

11) BORGEN (H. C.) 1963. Mucosal Disease in Denmark, virologic and serologic findings. Nord. Vet. Med., 15, 346.

12) CARLSON (R. G.), PRITCHARD (W. R.) et DOYLE (L. P.) 1957. The pathology of Virus Diarrhea of cattle in Alabama. Am. J. Vet. Res., 18, 560.

13) CHARTON (A.), FAYE (P.), LECOANET (J), PARODI (A.) et Le LAYEC (Cl.) 1963. Etude expérimentale d'une Maladie Muqueuse bovine. Bull. Acad. Vet., 36, 293.

14) COGGINS (L.), GILLESPIE (H. J.), ROBSON (P. S.), THOMPSON (J. D.), PHILLIPS (W. V.), WAGNER (W. C.) et BAKER (J. A.) 1961. Attenuation of Virus Diarrhea virus (strain Oregon C24V) for vaccine purpose. Cornell. Vet., 51, 539.

15) COGGINS (L.) et SEO (S.) 1963. Serological comparizon with rabbit antisera of Hog Cholera virus and bovine Virus Diarrhea virus. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 114, 778.

16) COGGINS (L.) 1964. Standardization of virus neutralization test for bovine Virus Diarrhea. Am. J. Vet. Res., 25, 103.

17) DARBYSHIRE (J. H.) 1960. A serological relationship between Swine Fever and Mucosal Disease of cattle. Vet. Record, 72, 331.

18) DARBYSHIRE (J. H.), BROWN (R. D.), SCOTT (G. R.) et HUCK (R. A.) 1961. A serological differentiation of Rinderpest and bovine Mucosal Disease by agar gel diffusion. Vet. Record, 73, 255.

19) DARBYSHIRE (J. H.) 1962. Etude à l'aide de la diffusion en gélose de la Maladie des Muqueuses des bovidés. I. Résultats préliminaires. Res. Vet. Sci., 3, 118.

20) DARBYSHIRE (J. H.) 1962. Etude à l'aide de la diffusion en gélose de la Maladie des Muqueuses des bovidés. II. Parenté sérologique entre la Maladie des Muqueuses et la Peste Porcine. Res. Vet. Sci., 3, 125.

21) DARBYSHIRE (J. H.) 1963. The isolation, separation and identification of two viruses of bovine Mucosal Disease. J. Comp. Path., 73, 309.

22) DIDERHOLM (H.) et DINTER (Z.) 1966. Infections R. N. A. derived from bovine Virus Diarrhea virus. Zentbl. Bakt. & Parasitke, 201 (I), 270.

23) DINTER (Z.) et BAKOS (K.) 1961. Virus associés à la maladie respiratoire aigüe et à l'entérite des bovins en Suède. Bull. Off. Int. Epiz., 56, 35

24) DINTER (Z.), HANSEN (H. J.) et RONEUS (O.) 1962. Untersuchungen ueber Mucosal Disease. I. Isolierung und Identifizierung des virus der Virus Diarrhoe. Zentbl. Vet. Med., 9, 739.

25) DINTER (Z.) 1963. Relationship between bovine Virus Diarrheoa virus and Hog Cholera virus. Zentbl. Bakt., 188 (I), 475.

26) DOW (C.), JARRETT (W. F. H.) et Mc INTYRE (W. I. M.) 1956. A disease of cattle in Britain resembling the virus Diarrheoa Mucosal Disease complex. Vet. Record, 68, 620.

27) FERNELIUS (A. L.) 1964. Non cytopathogenic bovine Viral Diarrhea viruses detected and titrated by immunofluorescence. Canad. J. Comp. Med. & Vet. Sci., 28, 121.

28) FERNELIUS (A. L.) et RITCHIE (A. E.) 1966. Mixed infections or contaminations of bovine Viral Diarrhea virus with Infectious Bovine Rhinotracheitis virus. Am. J. Vet. Res., 27, 241.

29) GILBERT (Y.) 1967. Enquête préliminaire sur la fréquence des anticorps neutralisant le virus de la Maladie des Muqueuses dans le sérum des bovins de quelques départements français. Bull. Acad. Vet., 40, 125.

30) GILLESPIE (J. H.) et BAKER (J. A.) 1959. Studies on Virus Diarrhea Cornell. Vet., 49, 439.

31) GILLESPIE (J. H.), BAKER (J. A.) et Mc ENTEE (K) 1960. A cytopathogenic strain of Virus Diarrhea virus. Vornell. Vet., 50, 73.

32) GILLESPIE (J. H.), COGGINS (L.), THOMPSON (J.) et BAKER (J. A.) 1961. Comparizon by neutralization test of strains of virus isolated from Virus Diarrhea and Mucosal Disease. Cornell. Vet., 51, 155.

33) GILLESPIE (J. H.), MADIN (S. H.) et DARBY (N. B.) 1962. Cellular resistance in tissue culture induced by non cytopathogenic strain, to a cytopathogenic strain of Virus Diarrhea virus of cattle. Proc. Soc. Exp. Biol., 110, 248.

34) GILLESPIE (J. H.), MADIN (S. H.) et DARBY (N. B.) 1963. Studies on Virus Diarrhea virus of cattle, with special reference to its growth in tissue culture and its ether susceptibility. Cornell. Vet., 53, 276.

35) GUTEKUNST (D. E.) et MALMQUIST (W. A.) 1963. Separation of a soluble antigen and infectious particles of bovine Viral Diarrhea viruses and their relationship to Hog Cholera. Canad. J. Comp. Med. & Vet. Sci., 27, 121.

36) GUTEKUNST (D. E.) et MALMQUIST (W. A.) 1964. Complement fixing and neutralizing antibody response to bovine Viral Diarrhea and Hog Cholera antigens. Canad. J. Comp. Med. & Vet. Sci., 28, 19.

37) GUTEKUNST (D. E.) et MALMQUIST (W. A.) 1965. Soluble antigen of bovine Viral Diarrhea virus. I. Intracellular synthesis, separation and characterization. Arch. Virusforschung, 15, 159.

38) HANSEN (H. J.) 1962. The histopathology of Mucosal Disease. 9th Nordisk Veterinaermode Kobenhavn, vol. I, 76-79.

39) HEDSTROM (H.) et ISAKSSON (A.) 1951. Entérite épizootique des bovins en Suède. Cornell. Vet., 41, 251.

40) HERMODSON (S.) et DINTER (Z.) 1962. Properties of bovine Virus Diarrhea virus. Nature London, 194, 893.

41) HUCK (R. A.) 1957. Mucosal Disease coplex. J. Comp. Path., 57, 267.

42) HUCK (R. A.) 1961. Mucosal Disease. Bull. Off. Int. Epiz., 56, 5.

43) INAHA (Y.), OMORI (T.) et KUMAGAI (T.) 1963. Detection of non cytopathogenic strains of Virus Diarrhea of cattle by the E. N. D. method. Arch. Virusforschung, 13, 425.

44) JARRETT (W. F. H.) 1958. British Mucosal Disease. Vet Record, 70, 48.

45) JARRETT (W. F. H.) 1959. Cité in ROEHRER (77).

46 KASSEM (H.) 1961. Les affections semi-muqueuses dans la R. A. U. (province Egyptienne). Bull. Off. Int. Epiz., 56, 47.

47) KNAZIEFF (A. J.) et PRITCHARD (W. R.) 1960. Antigenic relationship in the bovine Viral Diarrhea Mucosal Disease complex. Proc. U. S. Livestock. Sanitary Ass., 64, 344.

48) KNAZIEFF (A. J.), HUCK (R. A.), JARRETT (W. F. H.), PRITCHARD (W. R.) RAMSEY (F. K.), SCHIPPER (I. A.), STABER (M.) et LIESS (B.) 1961. Antigenic relationship of some bovine Viral Diarrhea Mucosal Disease viruses from U. S.A., Great Britain and West-Germany. Vet. Record, 73, 768.

49) KOKLES (R.), URBANEK (D.), LIEBERMANN (H.) et OLECHNOVITZ (A. F.) 1967. Archiv. Fuer Exp. Vet. Med., 21, 1295.

50) KUMAGAI (T.), SHIMCZU (T.), IKEDA (S.) et MATUMOTO (M.) 1961. A new in vitro method (E. N. D.) for detection and measurement of Hog Cholera virus and its antibody by means of effect of H. C. virus on Newcastle Disease virus in swine tissue culture. I. Establisment of standard procedure. II. Some characteristics of E. N. D. method. J. Immuno., 87, 245-256.

51) KUMAGAI (T.), SHIMCZU (T.), IKEDA (S.) et MATUMOTO (M.) 1962. Relations entre virus de la Peste Porcine et de la Diarrhée Bovine. Mat. Inst. Anim. Health Quart. Tokyo, 2, 201.

52) LEE (K. M.) et GILLESPIE (J. H.) 1957. Propagation of Virus Diarrhea virus in tissue culture. Am. J. Vet. Res., 18, 952.

53) LIEBERMANN (H.) 1966. Serological studies of the occurence of Mucosal Disease Viral Diarrhea in cattle in the baltic of Germany. Mh. Vet. Med., 21, 146.

54) LOAN (R. W.) 1964. Studies of the nucleic acid type and essential lipid content of Hog Cholera virus. Am. J. Vet. Res., 25, 1366.

55) MADIN (S. H.), YORK (C. J.) et Mc KERCHER (D. G.) 1956. Isolation of the Infectious Bovine Rhinitracheitis virus. Science, 124, 721.

56) MALMQUIST (W. A.), FERNELIUS (A. L.) et GUTEKUNST (D. E.) 1965. Interférence entre le virus de Maladie des Muqueuses et le virus de la Peste Porcine classique en cultures de cellules rénales de porc. AM. J. Vet. Res., 26, 1316.

57) MAYR (A.), BACHMANN (P. A.), SHEFFY (B. E.) et SIEGL (G.). Arch. Ges. Virusforschung, 21, 113.

58) MENGELING (L.), GUTEKUNST (D. E.), FURNELIUS (A. L.) et PIRTLE (E. C.) 1963. Demonstration of an antigenic relationship between Hog Cholera and bovine Viral Diarrhea viruses by immunofluorescence. Canad. J. Comp. Med. & Vet. Sci., 27, 162.

59) MOHIYUDDEN (S.) 1964. Une gastroentérite sur les bovins de l'état de Mysore qui ressemble aux maladies muqueuses nouvellement décrites. India Vet. J., 41, (2), 75.

60) NEWBERNE (J. W.), ROBINSON (V. B.) et ALTER (M. L.) 1961. Incidence of Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Virus Diarrhea. Vet. Med. U. S. A., 56, 395.

61) NOBEL (T. A.) et NEUMANN (F.) 1961. The pathology of a Mucosal Disease in Israël. Ref. Vet., 18, 103.

62) OLAFSON (P.), Mc CALLUM (A. D.) et FOX (F. H.) 1946. An apparently new transmissible disease of cattle. Cornell. Vet., 36, 205.

63) OLAFSON (P.) et RICKARD (C. G.) 1947. Further observations on the Virus Diarrhea of cattle. Cornell. Vet., 37, 104.

64) PANDE (P. G.) et KRISHNAMURTHY (D.) 1961. Fréquence et pathologie de certains syndrômes ressemblant à la Maladie des Muqueuses, observés récemment dans l'Inde sur des bovins et des buffles. Bull. Off. Int. Epiz., 55 (3-4), 706.

65) PRITCHARD (W. R.), BUNNELL (D.), MOSES (H. E.) et DOYLE (L. P.) 1954. Annual Report Purdue. Agric. Exp. Sta.

66) PRITCHARD (W. R.), CARLSON (R. G.), MOSES (H. E.) et TAYLOR (D. B.) 1955. Virus Diarrhea and Mucosal Disease. U. S. A. Livestock Sanitary Ass., 172-188.

67) PRITCHARD (W. R.), TAYLOR (D. B.), MOSES (H. E.) et DOYLE (L. P.) 1956. A transmissible disease affecting mucosae of cattle. J. A. V. M. A., 128, I.

68) PRITCHARD (W. R.) et CARLSON (R. G.) 1957. Virus Diarrhea in cattle. J. A. V. M. A., 130, 383.

69) PRITCHARD (W. R.) 1963. The bovine Viral Diarrhea Mucosal Disease. Adv. in Vet. Sci. New York Ac. Press., 8, 1.

70) PROVOST (A.), BOEGEL (K.), BORREDON (S.) et MAURICE (Y.) 1967. La Maladie des Muqueuses en Afrique Centrale. Observations cliniques et épidémiologiques. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop., 20 (I), 27.

71) PROVOST (A.), BORREDON (S.), et MAURICE (Y.) 1969. Identité immunologique de souches isolées en Afrique Centrale et des souches américano-européennes du virus de la Maladie des Muqueuses. Ann. Inst. Pasteur, 117 (I), 133.

72) PIRTLE (E. C.) et GUTEKUNST (D. E.) 1964. Relationship between the soluble antigen of Hog Cholera and bovine Viral Diarrhea viruses, prepared in tissue cultures. Vet. Record, 76, 1177.

73) RAMSEY (F. H.) et CHIVERS (W. H.) 1953. Mucosal Disease of cattle. Nord. Am. Vet., 34, 629.

74) RAMSEY (F. H.), CHIVERS (W. H.), TRAPP (A. L.) et WHITEMAN (C. E.) 1958. Incidence and mortality of Mucosal Disease in Iowa. Iowa St. Coll. Vet., 20, 101.

75) RISLAKKI (W.) 1960. Mucosal Disease complex in finnish cattle. Bull. Off. Int. Epiz., 54, 24.

76) ROBSON (D. S.), GILLESPIE (J. H.) et BAKER (J. A.) 1960. The neutralization test are an indicator of immunity to Virus Diarrhea. Cornell. Vet., 50, 503.

77) ROEHRER (H.) Traité des maladies à virus des animaux. Tome II. Affections à virus épithéliotropes. Ed. Vigot. Paris 1969.

78) ROMVARY (J.) 1965. Incidence of Virus Diarrhea among newborn calves. Hungary Acta Vet., 15, 341.

79) ROONEY (J. R.) 1957. Pathology of a bovine Mucosal Disease type. Am. J. Vet. Res., 18, 283.

80) SALISBURY (R. M.), HARTLEY (W. J.), Mc INTOSH (I. G.), HANSEN (N. F.) Te PUNGA (W. A.) et JAMIESON (E.) 1961. Un syndrôme des bovins ressemblant à la Maladie des Muqueuses en Nouvelle Zélande. Bull. Off. Int. Epiz., 56, 79.

81) SAURAT (P.) et CHANTAL (J.) 1966. L'immunofluorescence. Rev. Med. Vet., 117 (3), 217.

82) SAURAT (P.), CHANTAL (J.) et GILBERT (Y.) 1969. L'Immunofluorescence dans la Maladie des Muqueuses des bovins. Bull. Ass. Vet. Microb. & Spec. Mal. Infect., n° 5 de l'année 1969, page 131.

83) SEIBOLD (H. R.) 1956. The pathology of Mucosal Disease in Alabama. J. A. V. M. A., 128, 21.

84) SHEFFY (B. E.) COGGINS (L.) et BAKER (J. A.) 1962. Relationship between Hog Cholera virus Diarrhea virus of cattle. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 109, 349.

85) SCHIPPER (I. A.) et NOICE (F.) 1959. Isolation of Mucosal Disease virus by tissue culture in mixture 199 Morgan Morton and Parker. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 100, 84.

86) TAYLOR (D. O. M.), GUSTAFSON (D. P.) et OLAFSON (R. M.) 1963. Prop ties of some viruses of the Mucosal Disease Virus Diarrhea complex. Am. J. Vet. Res., 24, 143.

87) THOMSON (R. G.) et SAVAN (M.) 1963. Studies on Virus Diarrhea and Mucosal Disease of cattle. Canad. J. Comp. Path., 27, 207.

88) TOURNUT (J.), LACAZE (B.), REDON (P.) et LAPORTE (J.) 1961. Identification de la Maladie des Muqueuses dans le sud ouest de la France. Rev. Med. Vet., 112, 81.

89) UNDERDAHLA (N.R.), GRACE (O. D.) et HOERLEIN (A. B.) 1957. Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from bovine Mucosal Disease. Proc. Soc. Exp. Biol. & Vet. Med., 94, 795.

90) United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service Mucosal Disease Complex - U. S. Department of agriculture Report A. R. S., 22-27, 1956.

91) VOSS (H. J.) 1959. Observations relatives à la Maladie des Muqueuses en Allemagne. Deutsche Tieraerztliche Wochenschrift, 94, 795.

92) WALKER (R. V. L.) et OLAFSON (P.) 1947. Failure of Virus Diarrhea of cattle to immunize against Rinderpest. Cornell. Vet., 37, 107.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

P. SAURAT

Vu : Le Directeur de l'Ecole Vétérinaire

R. FLORIO

Vu : Le Président de la Thèse

Dr ENJALBERT

Vu : Le Président de l'Université
Paul Sabatier

L. LARENG

N° 426
Vu et Permis d'Imprimer
Toulouse, le 15 FEv. 1971
Le RECTEUR
Président du Conseil de l'Université

C. CHALIN

TABLE DES MATIERES

	Pages
La Maladie des Muqueuses	10
Le virus de la Maladie des Muqueuses	17
L'Immunofluorescence dans la Maladie des Muqueuses	23
Technique générale	24
Plan d'étude	25
Réactions préliminaires	27
Etude de la fixation des cultures cellulaires	30
Influence de l'adsorption du sérum anti-M. M. par des poudres de cellules	34
Essais de la réaction d'Immunofluorescence sur des cultures du virus sur cellules autres que les cellules rénales bovines	36
Spécificité de la réaction	38
Examen comparatif de différentes souches du virus de la Maladie des Muqueuses	42
Délais d'apparition de l'Immunofluorescence	44
Essai de titrage du virus	46
Mise en évidence des anticorps	48
Conclusions générales	50
Bibliographie	51